

⑪ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 44 07 484 A 1

⑤ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
A 61 K 45/06  
A 61 K 38/20

⑲ Aktenzeichen: P 44 07 484.0  
⑳ Anmeldetag: 7. 3. 94  
㉑ Offenlegungstag: 8. 8. 95

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③④  
03.12.93 DE 43 41 210.8

⑦① Anmelder:  
Kreutz, Werner, Prof. Dr., 79219 Staufen, DE

⑦② Erfinder:  
Kreutz, Werner, Prof. Dr., 79219 Staufen, DE; Kreutz,  
Marina Patricia, Dipl.-Biol. Dr., 93055 Regensburg,  
DE; Severin, Thomas, 79088 Freiburg, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Medikament zur Krebs-Therapie *Cancer therapy*

⑤⑦ Bei der Erfindung handelt es sich um ein Medikament zur Krebs-Therapie. Es werden dazu Lösungen von Substanzen vorgeschlagen, die das extrazelluläre Milieu von Krebszellen alkalisieren können und damit die natürliche Immunabwehr aktivieren. Je nach Applikationsweise durch Infusion über die Blutbahn oder direkt in den Tumorbereich werden zwei verschiedene Medikamentenzusammensetzungen vorgeschlagen, nämlich im ersten Falle Substanzen mit pKs von 5,5 bis 7 und im zweiten Falle Substanzen mit pKs > 7 oder eine Kombination beider.

Zur Verstärkung der Therapiewirkung können die Medikamente Interleukin-2, LAK-Zellen oder Interleukin-2 produzierende Zellen enthalten.

Anstatt oder in Kombination mit den vorgenannten Substanzen kann das Medikament Substanzen enthalten, die die Milchsäure-Sekretion durch Laktat-Proton-Co-Transport von Krebszellen blockieren.

DE 44 07 484 A 1

DE 44 07 484 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Medikament zur Krebs-Therapie. Bisherige Medikamente, die bei der Chemotherapie eingesetzt werden, bringen in der Regel nur Teilerfolge, d. h. sie führen in der Regel zu keiner endgültigen Heilung. Darüberhinaus wirken bisherige eingesetzte Substanzen häufig nur auf eine bestimmte Tumorkategorie. Ein weiterer Nachteil der jetzt eingesetzten Chemotherapeutika sind ihre oft schädlichen Nebenwirkungen, da sie generell auf proliferierende Gewebe cytostatisch wirken können. Große Schwierigkeiten bestehen bisher in der Bekämpfung der Metastasenbildung, was letztlich einen entscheidenden Erfolg bei der Krebs-Therapie verhindert hat.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Medikament für die Krebs-Therapie zu schaffen, das Metastasenbildung bekämpfen kann und das generell auf alle Tumortypen anwendbar ist.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird ein Medikament vorgeschlagen, das Substanzen mit einem pK-Wert zwischen ca. pH = 5,5 bis 7,0 enthält, wie z. B. Histidin, Histidinpeptide, Proteine, Hydrogenphosphate, Tris-Puffer und Bikarbonate, allein oder in Kombination und/oder daß es Substanzen enthält, die die Milchsäure-Sekretion durch Laktat-Proton-Co-Transport von Krebszellen blockieren (inhibieren).

Die Applikation kann durch Infusion in die Blutbahn oder direkt in den Tumorbereich erfolgen. Dieses Medikament beruht auf einem anderen Wirkprinzip als es bisherige Chemotherapeutika aufweisen. Es beinhaltet nicht eine Substanz, die cytotoxisch bzw. cytostatisch auf eine bestimmte Tumorkategorie wirkt, sondern reaktiviert die durch Tumorzellen blockierte natürliche Immunabwehr durch Alkalisierung des extrazellulären Milieus der Krebszellen. Tumorgewebe zeigen nämlich einen deutlich abgesenkten mittleren pH im extrazellulären Milieu von etwa pH = 6,5 bis 7,0 im Vergleich zu Normalgewebe und Blut von etwa pH = 7,2 bis 7,5. An der Krebszelloberfläche kann der pH sogar bis 5 absinken. Experimente mit humanen LAK-Zellen, d. h. mit Interleukin-2 stimulierten Killerzellen, die wir auf Krebszellen bei verschiedenen pH-Werten von pH = 6,0 bis 7,5 einwirken ließen, führten zum Ergebnis, daß nur in basischem Milieu die Killerzellen mit voller Cytotoxizität auf die Krebs-Targetzellen reagieren. Mit natürlichen Killerzellen von Mäusen konnten Loeffler et al vergleichbare Ergebnisse erzielen. Wir schließen daraus, daß in natürlichen Tumorgeweben die Immunabwehr durch eine pH-Charakteristik im Bereich von etwa pH = 5 bis 7 reguliert wird. In unseren Experimenten war z. B. bei pH = 6 die Immunabwehr total unterbunden, hatte bei pH = 6,8 nur noch zu 30 bis 50% funktioniert und bei pH > 7 bestand normale Immunabwehr.

Daraus folgt, daß durch künstlich erzwungene Verschiebungen des mittleren extrazellulären pH-Milieus in Tumorgeweben bzw. um Tumorzellen von pH = 6,5 bis 6,8 in den physiologisch relevanten pH-Bereich von pH = 7,2 bis 7,5, die natürliche Immunabwehrreaktion aktiviert werden kann und damit eine Tumor-Rückbildung erfolgen sollte. Dabei kommen Oligo-Peptiden und Poly-Peptiden des Histidins sowie Hydrogenphosphaten besondere Bedeutung hinsichtlich ihrer pH- bzw. pK-Eigenschaften zu. Histidin zeigt in wässrigen Lösungen von 20°C einen pK = 6,0. In Proteinen ist dieser pK-Wert nach pK = 6,4 bis 6,9 verschoben, z. B. in Myoglobin auf pK = 6,6, in Lysozym auf pK = 6,8, in Serumalbumin nach pK = 6,9. Peptidbildung von Histi-

din führt demnach zu pK-Verschiebungen bzw. pK-Vererhöhung um 0,4 bis 1,0 pH-Einheiten je nach Peptidstruktur. Histidin-Peptide mit einem pK = 6,5 bis 6,8 bei 37°C repräsentieren ideal geeignete Alkalisierungssubstanzen für das Extrazellulär-milieu von Tumoren. Gemäß der Titrationscharakteristik nimmt ein solches Peptid im Bereich von pH < 7,0 Protonen auf, d. h. wirkt alkalisch. Im Bereich pH > 7 geben sie ihre Protonen ab. Sie liegen dann deprotoniert vor. Histidinpeptide, die Tumorbereiche passieren, wurden gemäß der pH-Charakteristik Protonen binden, diese Protonen aus dem Tumorbereich transportieren, um sie dann in dem schwach basischen Blutplasma wieder abzugeben. Dies bedeutet, Histidin-Peptide stellen ideale Protonentransporter vom Tumorbereich in das Blutplasma dar. Dieser Carrier-Prozeß kann sich beliebig oft durch die Blutzirkulation bis zum metabolischen Abbau der Histidin-Peptide wiederholen. Vergleichbare Eigenschaften besitzen Hydrogenphosphate mit einem pK = 6,8 bis 6,9 bei 37°C. Auch diese Puffersubstanzen stellen reversible Protonencarrier im vorstehend beschriebenen Sinne dar.

Als Puffer einsetzbar ist jedoch auch Na<sup>+</sup> oder Kaliumbikarbonat mit einem pK = 6,1 bei 37°C. Allerdings mit zwei Einschränkungen gegenüber Histidin-Peptiden und Hydrogenphosphaten: Erstens dem ungünstiger liegenden, etwas zu niedrigen pK und zweitens der nur partiellen Reversibilität, da freigesetztes CO<sub>2</sub> aus dem Kreislauf eliminiert wird. Das Bikarbonat-Niveau muß durch Neu-Infusionen aufrechterhalten werden. Gemäß den Titrationscharakteristiken würden bei einer Passage von Bikarbonat durch einen Tumorbereich etwa 5 bis 10% Pufferkapazität ausgenutzt, gegenüber etwa 30 bis 70% bei Histidin-Peptiden und Hydrogenphosphaten.

Eine andere Zusammensetzung des Medikaments sieht vor, daß es basische Substanzen mit einem pK > 7, wie Arginin, Lysin, Proteinen, Salze schwacher organischer Säuren, allein oder in Kombination, enthält. Diese können direkt in Tumore über Kanüle injiziert werden, mit oder ohne abgegrenzter Tumorbereichszirkulation. Basische Substanzen wie Arginin mit einem pK = 12,5 können aufgrund dieses hohen pK-Wertes im physiologischen Bereich nur einmal Protonen binden, da eine Pufferregeneration wie vorangehend beschrieben wurde, nicht möglich ist, da im Gesamtorganismus ein pH > 7,5 nicht vorkommt. Arginin- oder Lysin-Infusionen in den Blutkreislauf wären daher sinnlos, da sie im Blutplasma bereits protoniert werden.

Die Wirkung der Zusammensetzung der beiden Medikamente kann verstärkt werden, wenn zusätzlich Interleukin-2 oder LAK-Zellen oder beide in den Medikamenten enthalten sind oder wenn natürliche oder gentechnisch veränderte Zellen zugegeben werden, die Interleukin-2 produzieren.

Wie vorstehend erläutert, schützen sich Krebszellen durch pH-Absenkungen, d. h. Ansäuerung des externen Krebszellmilieus, vor Immunabwehrreaktionen. Es gibt zwei alternative Möglichkeiten, das saure externe Milieu von Krebszellen auf das normale physiologische pH-Niveau von 7 bis 7,5 zu bringen:

1. Durch künstliche Alkalisierungsmaßnahmen wie vorbeschrieben oder
2. durch die Verhinderung des Ansäuerungsprozesses selbst.

Bei der zusätzlichen Maßnahme gemäß Punkt 2 wird ein Medikament vorgeschlagen, bei dem Lösungen von

Substanzen die Ansäuerung des extrazellulären Krebs-Milieus verhindern.

Die Ansäuerung des extrazellulären Krebs-Milieus geschieht durch Wasserstoff-Ionensekretion (Protonen-Sekretion) der Krebszellen. Dieser Protonen-Efflux vom Zellinnenraum in den Zellaußenraum erfolgt überwiegend gekoppelt mit einem Milchsäureanion-Transport (Laktat-Transport), d. h. in einem sogenannten Laktat-/H<sup>+</sup> Co-Transport. Dieser Laktat-/H<sup>+</sup> Co-Transport kann spezifisch blockiert werden. Diese Blockierung, auch Inhibition genannt, verhindert die Ansäuerung des extrazellulären Krebszell-Milieus und ermöglicht damit eine natürliche Immunabwehr. Solche Substanzen, die die Laktat-/H<sup>+</sup> Sekretion teilweise oder ganz verhindern, sind zum Beispiel:

- Mersalyl-Säure
  - Dichloroessig-Säure
  - D-Milchsäure-Isobutylester
  - Phloretin
  - Pentachlorphenol
  - $\alpha$ -Cyano-3-Hydroxy-Zimtsäure
  - 3,5-Dijodo-Salicylsäure
  - 2,4-Dichloro-Zimtsäure
  - 3,4-Dichloro-Zimtsäure
  - Quercetin
  - Zimtsäure-Äthyl-Ester
  - Probenecid
  - p-Chloromerkuribenzo-Sulfonat
  - Isobutyl-Carbonyl-Lactyl-Anhydrid
  - Diphenyl-Amino-4-Sulfon-Säure
- usw.

Bisher sind etwa 20 solcher Inhibitor-Substanzen bekannt, die sich jedoch nicht alle für Therapie-Versuche am Menschen eignen, da sie z. T. toxische Nebenwirkungen aufweisen.

Da der Zusammenhang zwischen externem Krebszell-pH und Immunzytotoxizität bisher nicht bekannt war, wurden diese Inhibitor-Substanzen zu dieser Art von Krebs-Therapie bisher auch nicht eingesetzt.

Neben dem Milchsäure-Transportsystem existiert ein zweiter Transportmechanismus, bei dem Protonen über die Zellmembran transportiert werden, nämlich der sogenannte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Austauschtransport, der bei allen Körperzellen eine Rolle spielt. Die Milchsäure-Transport-Inhibitoren müssen deshalb so ausgewählt werden, daß dieser für das Zellüberleben essentielle Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschtransport nicht inhibiert wird. Dies trifft für den überwiegenden Teil der Laktat-H<sup>+</sup>-Inhibitoren zu.

Von uns durchgeführte Experimente zeigen, daß sowohl periphere Blutzellen durch Laktat-Inhibitor-Substanzen nicht geschädigt werden, und daß auch die LAK Zell-Aktivität, d. h. die cytotoxischen Eigenschaften von LAK-Zellen nicht beeinträchtigt werden. Die Milchsäure-Inhibitor-Einwirkung auf Krebszellen führt dagegen zu eingeschränkter Proliferation von Krebszellen und teilweise sogar zu deren Absterben, d. h. zum "Selfkill" durch intrazelluläre Milchsäureanreicherung. Demnach werden durch Milchsäure-Inhibitor-Substanzen zwei Effekte erzielt, die cytotoxische Vernichtung der Krebszellen durch Effektorzellen des Immunsystems und die Induzierung eines Selfkill-Mechanismus.

Da die Inhibitor-Substanzen auf einzelne Krebszellen einwirken, können auch Metastasenbildungen, die für ihre invasive Phase pH-Absenkungen bis 4,5 bis 5 brauchen, und die sie selbst produzieren, durch Milchsäure-

Sekretionsblocker verhindert werden.

Zu beachten ist, daß auch Muskelzellen unter erhöhter Belastung Milchsäure-Sekretion zeigen. Die Laktat-H<sup>+</sup>-Inhibitor-Therapie muß daher unter minimaler Muskelbelastung, d. h. in Ruhestellung erfolgen. Unter diesen Bedingungen kann die intrazelluläre Milchsäure über den normalen Glykolyseweg metabolisiert werden.

Die Zuführung der Inhibitor-Lösungen kann entweder über den Blutkreislauf, oder durch direkte Applikation in den Tumor über Kanüle oder über eingegrenzte Blutzirkulation im Bereich des Tumors erfolgen.

Die Wirkung des Medikaments kann unterstützt werden durch zusätzliche Anwendung von Pufferlösungen, mit einem pK-Wert von 5,5 bis 7, wodurch eventuelle Restaciditäten im extrazellulären Tumor-Milieu weggepuffert werden und die extrazelluläre Phase pH-stabil gehalten wird.

Die eingangs aufgeführten Medikamenten-Kombinationen, die Interleukin-2, LAK-Zellen oder Interleukin-2 produzierende Zellen enthalten, können ebenfalls zur Verstärkung der Anti-Tumorwirkung der Milchsäure-Sekretionsblocker eingesetzt werden.

Nochmals kurz zusammengefaßt handelt es sich bei der Erfindung um ein Medikament zur Krebs-Therapie. Es werden dazu Lösungen von Substanzen vorgeschlagen, die das extrazelluläre Milieu von Krebszellen alkalisieren können und damit die natürliche Immunabwehr aktivieren. Je nach Applikationsweise durch Infusion über die Blutbahn oder direkt in den Tumorbereich werden zwei verschiedene Medikamentenzusammensetzungen vorgeschlagen, nämlich im ersten Falle Substanzen mit pKs von 5,5 bis 7 und im zweiten Falle Substanzen mit pKs > 7 oder einer Kombination beider.

Zur Verstärkung der Therapiewirkung können die Medikamente Interleukin-2, LAK-Zellen oder Interleukin-2 produzierende Zellen enthalten.

Weiterhin kann das Medikament Substanzen enthalten, mit denen die Ansäuerung (Acidose) des Extrazellulärraums von Krebszellen durch Blockierung (Inhibition) der Milchsäure Sekretion (Laktat/H<sup>+</sup>-Co-Transport) der Krebszellen verhindert wird. Durch die Unterbindung der Ansäuerung kann die natürliche Immunabwehr durch cytotoxische Killerzellen eingeleitet werden. Zur Beseitigung von Restaciditäten, Stabilisierung und Äquilibrierung des pH-Milieus von Tumoren, sollen Puffer mit pK-Werten von 5,5 bis 7, d. h. das Medikament nach Anspruch 1 der Hauptanschrift angewendet werden. Zur Verstärkung der Therapie-Wirkung können die Medikamente, die Interleukin-2, LAK-Zellen oder Interleukin produzierende Zellen enthalten, eingesetzt werden.

#### Patentansprüche

1. Medikament zur Krebs-Therapie, dadurch gekennzeichnet, daß es Substanzen mit einem pK-Wert von ca. 5,5 bis 7,0 wie Histidin, Histidinpeptide, Proteine, Hydrogenphosphate, Tris-Puffer und Bikarbonate, allein oder in Kombination enthält, und/oder es Substanzen enthält, die die Milchsäure-Sekretion durch Laktat-Proton-Co-Transport von Krebszellen blockieren (inhibieren).

2. Medikament zur Krebs-Therapie, dadurch gekennzeichnet, daß es basische Substanzen mit einem pK > 7, wie Arginin, Lysin, Proteine, Salze schwacher organischer Säuren, allein oder in Kombination, enthält.

3. Medikament zur Krebs-Therapie nach Anspruch

1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es Substanzen nach Anspruch 1 und 2 in Kombination enthält.  
4. Medikament zur Krebs-Therapie nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es Interleukin-2 enthält.  
5. Medikament zur Krebs-Therapie nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es LAK-Zellen enthält.  
6. Medikament zur Krebs-Therapie nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß natürliche oder gentechnisch veränderte Zellen, die Interleukin-2 produzieren, im Medikament enthalten sind.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65